

Korelasi Antara MIB-1, AgNOR dan Apoptosis Caspase-3  
dengan Respons Kemoradioterapi pada Kanker Servik  
(lin Kurnia)

ISSN 1411 – 3481

## KORELASI ANTARA MIB-1, AgNOR DAN APOPTOSIS CASPASE-3 DENGAN RESPONS KEMORADIOTERAPI PADA KANKER SERVIK

lin Kurnia<sup>1</sup>, Budiningsih Siregar<sup>2</sup>, Setiawan Soetopo<sup>3</sup>, Irwan Ramli<sup>2</sup>, Tjahya  
Kurjana<sup>3</sup>, Andriano<sup>2</sup>, Maringan DL Tobing<sup>3</sup>, Bethy Suryawathi<sup>3</sup>, Devita Tetriana<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi - BATAN

<sup>2</sup> Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo

<sup>3</sup> Rumah Sakit Hasan Sadikin

E-mail : kurnia@batan.go.id

Diterima: 16-12-2012

Diterima dalam bentuk revisi: 02-01-2013

Disetujui: 11-01-2013

### ABSTRAK

**KORELASI ANTARA MIB-1, AgNOR DAN APOPTOSIS CASPASE-3 DENGAN RESPONS KEMORADIOTERAPI PADA KANKER SERVIK.** Salah satu cara pengobatan kanker servik adalah dengan kemoradioterapi melalui pemberian radioterapi dan kemoterapi secara bersamaan pada kanker servik stadium lanjut lokal. Respons kemoradioterapi dipengaruhi oleh faktor biologis yaitu kinetika sel yang terdiri dari proliferasi dan kematian sel. Pada penelitian ini dipelajari korelasi antara *biomarker* proliferasi sel kanker, yaitu AgNOR, MIB-1, dan ekspresi apoptosis jalur caspase-3 dengan respons kemoradioterapi pada kanker servik. Dua puluh satu sediaan mikroskopik jaringan kanker servik yang diambil dari biopsi pasien sebelum menerima tindakan kemoradioterapi diberi pewarnaan AgNOR, sedangkan deteksi MIB-1 dan apoptosis caspase-3 dilakukan dengan teknik immunohistokimia. Setelah selesai menerima kemoradioterapi dilakukan pengamatan respons klinik dengan cara *pelvic control*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebelum kemoradioterapi tidak ditemukan korelasi nilai AgNOR, MIB-1 dengan apoptosis ( $p>0,05$ ). Proliferasi sel yang diamati dengan AgNOR dan MIB-1 sebelum kemoradioterapi tidak menunjukkan adanya korelasi dengan respons jaringan kanker setelah kemoradioterapi, namun ekspresi apoptosis menunjukkan korelasi positif dengan respons kemoradioterapi. Indeks apoptosis caspase-3 yang diperoleh dapat dijadikan bahan pertimbangan pada penjadwalan kemoradioterapi kanker servik.

**Kata kunci:** AgNOR, MIB-1, apoptosis caspase-3, kanker servik, kemoradioterapi

### ABSTRACT

**THE CORRELATION BETWEEN MIB-1, AgNOR, AND CASPASE-3 APOPTOSIS WITH CHEMORADIOTHERAPY RESPONSE IN CERVICAL CANCER.** Chemoradiotherapy is one of treatments for the locally advanced cervical cancer given by concurrent radiotherapy combined with chemotherapy in the same time. Chemoradiotherapy response is influenced by biological factor i.e. cell kinetic that consists of cell proliferation and death. In this research, the correlation between AgNOR, MIB-1 cell proliferation biomarker and the expression of apoptotic caspase-3 with chemoradiotherapy response of cervical cancer has been studied. Twenty one microscopic tissue samples were taken from cervical cancer biopsies before radiotherapy. The tissue samples were stained with AgNOR, whereas MIB-1 and apoptosis caspase-3 in the tissue samples were detected by immunochemistry technique. After the completion of chemoradiotherapy treatment, the clinical response was observed by pelvic control method. The result of this research show that there is no correlation between AgNOR, MIB-1 value with apoptosis ( $p>0.05$ ) before chemoradiotherapy. Cell proliferation observed by AgNOR and MIB-1 before chemoradiotherapy indicate no correlation with chemoradiotherapy response, however the apoptotic expression shows positive correlation with chemoradiotherapy response. The index of caspase-3 apoptosis obtained from this research can be used for considering the chemoradiotherapy schedule for the cervical cancer patient.

**Keywords:** AgNOR, MIB-1, apoptosis caspase-3, cervical cancer, chemoradiotherapy

## 1. PENDAHULUAN

Kanker servik merupakan penyakit keganasan yang paling tinggi kasusnya di Indonesia. Secara umum penderita datang ke rumah sakit sudah berada pada stadium lanjut lokal. Pengobatan utama kanker servik pada stadium lanjut lokal ini adalah radioterapi yang dapat dikombinasikan dengan kemoterapi berupa *concurrent chemoradioterapy* (1,2).

Radioterapi merupakan modalitas penting dalam pengobatan pasien kanker yang diterapkan baik sendiri atau dalam kombinasi dengan modalitas pengobatan lainnya, yaitu pembedahan atau kemoterapi. Pada penderita kanker servik radioterapi secara bermakna memberikan respons terapi kuratif maupun paliatif, dan digunakan di sekitar 40-50% dari semua kasus kanker servik (3).

Dayaguna radioterapi dipengaruhi oleh 2 faktor, yaitu faktor biologis dan fisik. Terdapat tiga parameter biologis penting yaitu proliferasi, radiosensitivitas intrinsik dan hipoksia (4). Ketiga faktor ini sebelumnya dianggap menjadi masalah utama pada pengaturan jadwal radioterapi dan juga berpengaruh dalam penentuan sensitivitas sel kanker terhadap radioterapi (5). Penerapan kinetika sel dalam kanker memiliki pemikiran yang sederhana, bahwa percepatan proliferasi yang terjadi pada sel kanker berkaitan dengan potensi yang lebih besar pada fase sel yang bersifat radiosensitif dan risiko repopulasi yang lebih besar akibat kegagalan dengan pengobatan umumnya. Dalam hal ini diasumsikan bahwa percepatan proliferasi sel kanker merupakan faktor prognostik yang tidak menguntungkan

(6-8). Oleh karena itu, pengetahuan yang lebih rinci tentang kinetika sel kanker secara individu menjadi penting untuk memprediksi prognosis dan aplikasinya dalam pemberian radioterapi yang bersifat individu dan spesifik (9).

Aktivitas proliferasi sel memiliki nilai prognostik (prediksi ke depan) pada kanker. Proliferasi sel kanker dapat dianalisis menggunakan teknik immunohistokimia melalui antibodi monoklonal Ki-67 (MAb), atau MIB-1 dengan cara mengidentifikasi antigen pada inti sel yang muncul sepanjang siklus sel (G1 akhir, S, G2, dan fase M) (10,11). Teknik lainnya seperti pewarnaan AgNOR (*Ag-Nucleolar Organizer Region*) digunakan untuk mengamati adanya protein yang terkait dengan proses pembelahan sel, pada fase G1 (gap 1), S (sintesis) dan G2 (gap 2). Pada sediaan mikroskopik terlihat sebagai bintik hitam dalam inti sel atau nukleus (12).

Pada berbagai jaringan kanker, seperti juga halnya pada jaringan normal, di bawah kondisi fisiologis tertentu serta dalam respons terhadap radiasi pengion, radiasi ultraviolet, hipertermia ringan, ablasi hormon, dan regimen kemoterapi tertentu, terjadi proses kematian sel yang terprogram yang disebut juga dengan apoptosis (13,14). Bentuk kematian sel ini sangat penting secara fungsional dan biologis. Tingkat apoptosis berkaitan dengan respons radiasi pada jaringan kanker dan berpengaruh pada prognosis. Apoptosis merupakan faktor prognostik yang berperan dalam pengobatan kanker, karena apoptosis erat hubungannya dengan radiosensitivitas serta juga dipengaruhi oleh proliferasi sel (13,15).

Dalam proses apoptosis baik di tingkat embryogenik atau bersifat patologik berperan suatu peptida dari kelompok protein sistein protease yang disebut dengan caspase. Caspase pada apoptosis masuk ke dalam kelompok caspase yang berperan dalam proses inflamasi. Caspase-3 merupakan kelompok caspase yang paling penting dalam proses apoptosis, dan dengan teknik immunohistokimia apoptosis ini akan terlihat sebagai gumpalan coklat dalam nukleus (16,17).

Hubungan antara *marker* proliferasi AgNOR dan MIB-1 dengan respons radioterapi telah diteliti (18,19), dan diketahui adanya kecenderungan korelasi positif. Apoptosis terkait dengan reoksigenasi kanker servik selama radioterapi (20).

Pada penelitian ini akan dipelajari hubungan antara *biomarker* AgNOR dan MIB-1 sebagai petanda proliferasi sel terhadap apoptosis yang diamati melalui petanda caspase-3, sebelum radioterapi. Selain itu dipelajari juga korelasi antara AgNOR, MIB-1 dan apoptosis terhadap respons kemoradioterapi pada kanker servik. Dari hasil penelitian ini diharapkan diketahui *biomarker* yang dapat digunakan dalam mempertimbangkan pengobatan kanker servik dengan kemoradioterapi.

## 2. TATA KERJA

### 2.1. Sediaan Mikroskopik

Sediaan mikroskopik yang digunakan pada penelitian ini berasal dari 21 sampel jaringan biopsi yang diambil 3 - 5 hari sebelum pemberian radioterapi. Jaringan biopsi diambil dari penderita karsinoma sel

skuamosa servik uteri (KSS) stadium lanjut lokal yang dirujuk oleh Departemen Obstetrik Ginekologi ke Departemen Radioterapi di RSCM (Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo, Jakarta) dan RSHS (Rumah Sakit Hasan Sadikin, Bandung) tahun 2010-2011 untuk memperoleh tindakan radioterapi. Secara klinis, sampel mikroskopis terdiri dari sel tumor stadium II B (sel tumor menyebar sampai parametrium) sampai stadium IIIB (sel tumor telah mencapai dinding panggul/hidronerosis atau gangguan fungsi ginjal) (21). Setelah jenis sel tumor diverifikasi oleh ahli patologi, sediaan biopsi kanker diwarnai dengan hematoxilin eosin untuk pembuatan *ustained slide*.

### 2.2. Pulasan Immunohistokimia MIB-1

Blok parafin berisi jaringan biopsi kanker dipotong dengan ketebalan 4  $\mu$ m menggunakan mikrotom, kemudian dilakukan deparafinasi dengan xilol. Selanjutnya dilakukan rehidrasi dengan etanol konsentrasi menurun, diikuti dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) 3  $\times$  5 menit. Sediaan jaringan kemudian diinkubasi pada DAKO<sup>R</sup> Buffer Antigen Retrieval pada *microwave* dengan suhu 94 °C selama 20 menit dan dilanjutkan dengan pendinginan selama 20 menit pada suhu ruangan. Sediaan dicuci dengan PBS 3  $\times$  5 menit, dan diinkubasi pada Blok Peroksidase (Novocastra<sup>R</sup>). Selanjutnya sediaan dicuci kembali dengan PBS 3  $\times$  5 menit dan diinkubasi semalam dengan anti bodi MIB-1 pada suhu 4 °C. Setelah pencucian dengan PBS 3  $\times$  5 menit, sediaan kembali diinkubasi dengan antibodi ke 2 yaitu Novolink *Horse*

*Radish Peroxidase* (HRP), Novocastra<sup>R</sup> selama 60 menit pada temperatur ruang. Setelah inkubasi, sediaan dicuci dengan PBS 3 × 5 menit dan dilakukan *counter stain* dengan hematoksilin (Novocastra<sup>R</sup>). Selanjutnya, dilakukan dehidrasi pada sediaan menggunakan etanol konsentrasi meningkat, dilanjutkan dengan proses penjernihan dengan xilol, dan *mounting* (25).

### 2.3. Pulasan Immunohistokimia Caspase-3

Sediaan mikroskopik dideparafinasi dengan xilol, kemudian dilakukan rehidrasi dengan etanol konsentrasi menurun, dan diikuti dengan PBS 3 × 5 menit. Sediaan jaringan kemudian diinkubasi pada DAKO<sup>R</sup> Buffer antigen Retrieval pada *mirowave* suhu 98 °C selama 10 menit dan dilanjutkan dengan pendinginan selama 20 menit pada suhu ruangan. Setelah dicuci dengan PBS/Tween 3 × 3 menit, sediaan jaringan diinkubasi pada *Quench Peroxidase Cell Signaling*<sup>R</sup>, dan dicuci kembali dengan PBS/Tween 2 × 3 menit. Proses selanjutnya adalah inkubasi pada *blocking solution* selama 60 menit dan antibodi primer (apoptosis) pada suhu 4 °C selama 1 malam. Sediaan dicuci dengan PBS/Tween 3 × 5 menit lalu diinkubasi pada antibodi kedua selama 30 menit dan dicuci kembali dengan PBS/Tween 3 × 5 menit dan DAB (*Deamino Benzidine*) yang bersifat chromogen selama 2 – 10 menit. Selanjutnya dilakukan *counter stain* pada sediaan dengan hematoksilin eosin dan dilakukan dehidrasi dengan etanol konsentrasi meningkat, penjernihan dengan xilol, dan penempelan. Pewarnaan apoptosis dilakukan dengan teknik

immunohistokimia menggunakan *Apoptosis Marker: SignalStain Cleaved Caspase-3* (Asp175), IHC *Detection Kit*.

### 2.4. Pulasan AgNOR (*silver* nitrat)

Pada sediaan mikroskopik dilakukan deparafinasi dengan xilol, rehidrasi dengan etanol konsentrasi menurun dan terakhir dengan air deionisasi masing-masing selama 5 menit, kemudian diwarnai dengan AgNOR. Pewarna AgNOR merupakan larutan perak koloidal, yang dibuat dari 2% bubuk gelatin dalam air deionisasi pada *waterbath* dengan suhu 60 – 70 °C. Ke dalam larutan ditambah asam formiat murni 1% kemudian dicampur dengan 50% perak nitrat dalam air deionisasi dengan perbandingan 1:2. Selanjutnya, larutan perak nitrat koloidal ini diteteskan pada sediaan jaringan kanker melalui filter milipore 0,22 µm dan didiamkan selama 40 menit. Sediaan jaringan kanker diinkubasi dalam larutan tiosulfat 5% selama 15 menit kemudian didehidrasi dengan alkohol bertingkat dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%, 100% dan dilanjutkan dengan penjernihan menggunakan xilol. Setelah sediaan kering, jaringan ditutup dengan gelas penutup dan dilakukan penghitungan AgNOR (12).

### 2.5. Penghitungan AgNOR, MIB-1 dan Apoptosis Caspase-3

Penghitungan butiran AgNOR dilakukan secara acak dari 100 sel menggunakan mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 100× (27). Nilai AgNOR yang dihitung adalah rerata AgNOR dalam satu inti sel.

Indeks MIB-1 dan indeks apoptosis caspase-3 yang merupakan persentase jaringan kanker positif dievaluasi secara acak untuk menghindari hasil yang bias. Tiga lapangan pandang pada sediaan di bawah mikroskop dipilih secara acak, minimal berisi 1000 sel (menggunakan foto pada perbesaran mikroskop 400×). Untuk meminimalkan variasi dilakukan penghitungan ulang sehingga diperoleh variasi tidak lebih dari 5%. Indeks apoptosis caspase-3 dengan kadar di atas 0,02 dikelompokkan sebagai apoptosis tinggi, dan kadar dibawah 0,02 dinilai sebagai apoptosis rendah (18).

## 2.6. Kemoradioterapi

Pasien penderita kanker servik mendapat terapi kombinasi menggunakan *External Beam Radiotherapy* (EBRT) dengan sinar gamma dari Co-60 dan *High Dose Rate Intracavitary Brachytherapy* (HDR-ICBT) menggunakan sumber radioisotop <sup>192</sup>Ir. Terapi EBRT diberikan pada *whole pelvis*, dengan target volume meliputi kanker primer, uterus, dan jaringan kelenjar di iliaka internal, presakral, iliaka eksternal, dan iliaka komunis. Selanjutnya dilakukan terapi HDR-ICBT menggunakan pesawat Microselectron (Nucletron International, Amsterdam, Netherlands). Tindakan HDR-ICBT diberikan dalam dua fraksi (850 cGy / fraksi) pada titik utama yang menjadi acuan terimaan dosis spesifik pada brakiterapi kanker servik. Pasien diberi cisplatin dengan dosis 40 mg/m<sup>2</sup> pada hari ke 1, 8, 15, 22, dan 29, secara konkuren sekitar 2 jam pra radiasi (22 - 24).

## 2.7. Respons Kemoradioterapi

Pengamatan respons setelah kemoradioterapi dilakukan oleh dokter radioonkologi secara *pelvic control*. Respons kemoradioterapi digolongkan menjadi respons sebagian (*partial response*), yaitu pengurangan ukuran jaringan kanker terlihat lebih dari 50% dan respons keseluruhan (*complete respons*) yaitu jaringan kanker relatif tidak terlihat lagi (26)

## 2.8. Analisis Statistik

Uji secara statistik dengan *Mc Nemar test* dilakukan terhadap indeks apoptosis dengan respons kemoradioterapi. Pada uji *Mc Nemar*, indeks apoptosis dikelompokkan menjadi indeks apoptosis tinggi yang secara numerik diberi nilai 2 dan indeks apoptosis yang rendah diberi nilai 1, sedangkan respons kemoradioterapi dikelompokkan menjadi respons kemoradioterapi *partial* yang diberi nilai 1 dan *complete response* diberi nilai 2. Kemudian dibuat plot secara kolom untuk indeks apoptosis dan respons kemoradioterapi.

Uji Anova dilakukan terhadap nilai AgNOR dan indeks MIB-1 dengan kemoradioterapi pada tingkat kepercayaan 5% ( $p = 0,05$ ), kemudian diplotkan menurut Box and Whisker (27).

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

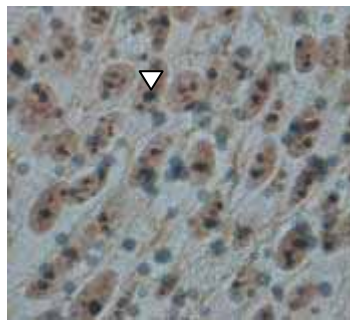
Hasil pengamatan pada sediaan mikroskopis jaringan kanker servik yang ditandai dengan pewarnaan AgNOR, imunohistokimia MIB-1, dan apoptosis caspase-3 dapat dilihat pada Gambar 1-3.

Petanda AgNOR dijumpai di dalam inti sel sebagai butiran berwarna hitam.

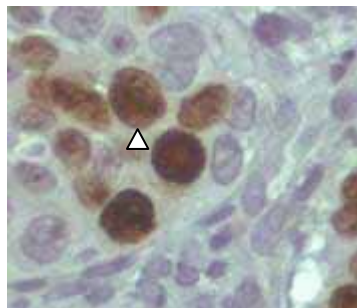
(Gambar 1). Pada penelitian ini diperoleh rerata AgNOR dari 21 pasien sebesar  $5,58 \pm 1,09$ , berkisar dari 4,24 sampai 8,65. Nilai AgNOR yang diperoleh pada penelitian ini sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian lain pada kanker servik, yaitu  $4,93 \pm 1,02$  (28) dan pada kanker servik jenis adenoskuamosa sebesar 4,4 (29). Perbedaan ini kemungkinan disebabkan

oleh variasi aktivitas proliferasi sel kanker.

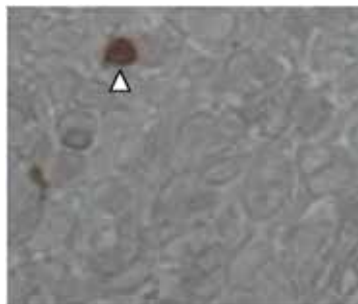
Gambar 2 memperlihatkan jaringan sel kanker yang ditandai dengan pewarnaan MIB-1. Nilai rerata indeks MIB-1 adalah  $0,44 \pm 0,13$  (440 sel dari 1000 sel kanker servik dalam fase mitosis, atau mengalami pertumbuhan) dengan kisaran 0,21 sampai 0,68.



Gambar 1. Butiran AgNOR berwarna hitam yang ditunjukkan dengan tanda panah putih, di dalam inti sel kanker servik sebelum radioterapi (perbesaran 10 x 40).



Gambar 2. Ekspresi MIB-1 (berwarna coklat) pada inti sel kanker servik sebelum radioterapi (perbesaran 10x40).

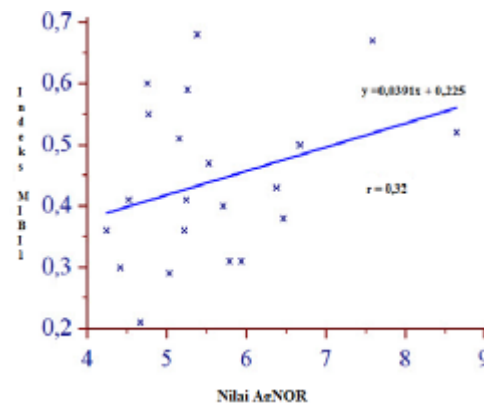


Gambar 3. Ekspresi apoptosis caspase-3 (berwarna coklat) pada inti sel kanker servik sebelum kemoradioterapi (perbesaran 10 x 40).

Laporan penelitian lain pada kanker servik menyatakan indeks MIB-1 sebesar  $0,25 \pm 0,07$  (30) dan pada kanker paru sebesar  $0,30 \pm 0,1$ , serta ditemukan korelasi positif antara nilai AgNOR dengan indeks MIB-1 (31). Terdapatnya perbedaan nilai AgNOR dan nilai indeks MIB-1 tersebut disebabkan oleh perbedaan proliferasi sel dalam suatu potongan jaringan kanker servik, demikian pula pada hasil histopatologi sel kanker lainnya, seperti kanker paru.

Nilai AgNOR mempunyai korelasi positif dengan indeks MIB-1 seperti diperlihatkan Gambar 4. Nilai AgNOR terkait dengan ekspresi protein NOR yang terjadi antara fase G1, S dan G2, serta terekspresi lebih tinggi pada fase S (18), sedangkan indeks MIB-1 muncul pada semua siklus sel kecuali G0 (19). Korelasi antara AgNOR dengan MIB-1 juga diperoleh pada penelitian lain untuk sel kanker servik (28) dan paru (31).

Penilaian apoptosis dikelompokkan menjadi berkisar 0,00 sampai dengan di atas 0,02. Nilai indeks apoptosis lebih dari 0,02 dimasukkan ke dalam kelompok apoptosis tinggi, sedangkan indeks apoptosi kurang dari 0,02 dikelompokkan sebagai apoptosis rendah. Pada hasil penelitian Sheridan, indeks apoptosis pada kanker servik diamati dengan metode Tunel berkisar antara 0,01 – 0,08 (20).



Gambar 4. Korelasi antara AgNOR dan MIB-1 pada sel kanker servik sebelum kemoradioterapi.

Tabel 1 memperlihatkan nilai AgNOR, MIB-1 dan apoptosis caspase-3 pada kanker servik sebelum kemoradioterapi. Baik pada AgNOR maupun MIB-1 secara statistik tidak ditemukan perbedaan bermakna antara kelompok jaringan kanker yang mempunyai ekspresi apoptosis tinggi dan rendah dengan nilai  $p > 0,05$  ( $p = 0,16$ ). Nilai AgNOR pada apoptosis tinggi lebih besar dibanding pada apoptosis rendah. Perbedaan tersebut berkaitan dengan peristiwa apoptosis yang terjadi setelah fase G2 (bagian dari ekspresi AgNOR). Demikian pula ekspresi MIB-1 yang terkait pada proses proliferasi sel secara umum, kecuali fase G0. Peningkatan jumlah AgNOR berkaitan dengan pembelahan *nucleolin* (komponen utama protein *nucleolar organizer region* yang mengkode gen NCL) menjadi berukuran yang lebih kecil.

Tabel 1. Nilai AgNOR, MIB-1 dan apoptosis caspase-3 pada kanker servik sebelum kemoradioterapi

No	Nilai apoptosis	AgNOR	MIB-1
1	Tinggi (7)	6,06 ( $p=0,16$ )	0,47 ( $p=0,36$ )
2	Rendah (14)	5,35	0,42

Tabel 2. Nilai AgNOR pada respons kemoradioterapi *partial* (buruk) dan *complete* (baik)

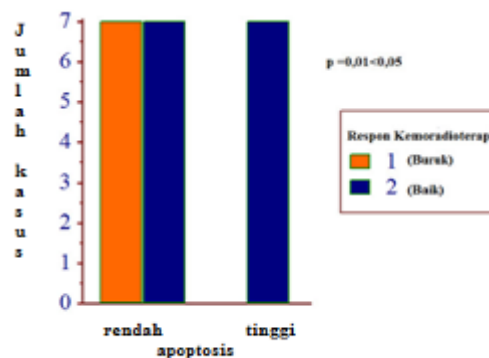
No	Respons radioterapi	AgNOR	MIB-1
1	<i>Partial</i> (n=7)	5,56 (p=0,95)	0,43 (p=0,81)
2	<i>Complete</i> (n=14)	5,59	0,45

Pada penelitian secara *in vitro* dengan menggunakan *cell line* HL-60 yang diinduksi untuk berapoptosis, Kito *et al* (31) menemukan adanya penguraian nukleolin (salah satu komponen utama dari protein yang dapat diamati dengan AgNOR) berukuran 110 kd menjadi berukuran 80 kd. Penguraian ini berkaitan dengan terjadinya apoptosis yang diinduksi oleh bermacam stimulus.

Hubungan antara nilai AgNOR dan MIB-1 dengan respons kemoradioterapi ditabulasikan pada Tabel 2. Secara statistik tidak dijumpai perbedaan nilai AgNOR dan MIB-1 dengan respons kemoradioterapi, nilai  $p > 0,05$  ( $p = 0,95$  dan  $p = 0,81$ ). Pada penelitian sebelumnya dengan pasien kanker servik berbeda, ditemukan kecenderungan perbedaan nilai AgNOR pada respons radioterapi *complete* dengan *partial*, walaupun secara statistik tidak berbeda (29). Selanjutnya, pada penelitian lain disebutkan bahwa indeks MIB-1 yang tinggi akan memberikan respons kemoradioterapi baik dibanding indeks MIB-1 yang lebih rendah. Oka (19) menyatakan bahwa indeks MIB-1 yang tinggi berkaitan dengan tingginya jumlah sel yang berada dalam fase non G0, seperti mitosis, G1, S dan G2. Fase S dan mitosis merupakan bagian dari fase sel yang bersifat lebih radiosensitif (25). Pada penelitian Wilson (4), indeks MIB-1 yang tinggi sebelum pengobatan tidak memberikan manfaat yang bermakna

ababila diberikan pengobatan radioterapi yang dipercepat.

Ekspresi apoptosis mempunyai korelasi dengan respons kemoradioterapi. Ekspresi apoptosis yang tinggi sebelum kemoradioterapi menunjukkan *complete response* yang baik dibanding dengan indeks apoptosis yang rendah (Gambar 5).



Gambar 5. Ekspresi apoptosis pada respons kemoradioterapi kanker servik.

Pada indeks apoptosis di bawah 0,02 jumlah pasien yang memberikan respons kemoradioterapi baik dan buruk sama, sedangkan pada indeks apoptosis di atas 0,02, seluruhnya menunjukkan respons kemoradioterapi baik. Hasil ini menunjukkan bahwa kecenderungan apoptosis yang terjadi secara spontan sebelum radioterapi juga sama dengan sel kanker yang mengalami kematian melalui apoptosis setelah menerima radioterapi.

Pada penelitian apoptosis yang menggunakan metode Tunel, ditemukan sejumlah hasil yang berbeda dengan hasil



penelitian ini. Kim (32) dan Huang (33) mengamati apoptosis pada kanker servik yang diberi perlakuan dengan radioterapi dan memperoleh bahwa indeks apoptosis spontan yang rendah mencerminkan respons radiasi jangka pendek yang lebih baik dibanding jaringan kanker yang mempunyai indeks apoptosis yang tinggi. Namun pada penelitian Bhosley (34), yang menggunakan sampel pasien adenokarsinoma servik diperoleh bahwa indeks apoptosis yang tinggi sebelum radioterapi akan menunjukkan respons yang baik setelah radioterapi. Pada kasus karsinoma sel skuamosa, Levine (35) justru menemukan indeks apoptosis yang tinggi akan memberikan respons radioterapi yang buruk. Hal ini berkaitan dengan adanya hipoksia yang akan memberikan respons radioterapi yang buruk, meskipun pada penelitian Kim (32) tidak ditemukan adanya korelasi antara apoptosis dengan hipoksia, akan tetapi ditemukan adanya korelasi dengan reoksigenasi. Selanjutnya Suzuki (36) mengemukakan bahwa apoptosis yang tinggi ada hubungannya dengan repopulasi tumor, sehingga ada kecenderungan penambahan populasi tumor yang cepat pada saat radioterapi. Apoptosis yang dideteksi dengan caspase-3 juga terkait dengan kematian sel kanker yang terjadi akibat kegagalan mitosis (sama dengan pada proses kemoterapi) seperti yang diamati secara *in vitro* pada sel *He La* (37). Sejumlah penelitian menyebutkan bahwa ada potensi meningkatkan fungsi caspase-3 untuk meningkatkan efektifitas pengobatan kanker (38,39).

Dari penelitian ini diperoleh bahwa

kanker servik yang belum diberi perlakuan radioterapi mempunyai indeks apoptosis caspase-3 yang tinggi dan menunjukkan respons radioterapi lebih baik dibanding sebaliknya. Selanjutnya penderita yang mempunyai indeks apoptosis caspase-3 yang tinggi dapat dipertimbangkan memperoleh prioritas lebih awal untuk menerima kemoradioterapi dibanding dengan pasien yang lebih rendah.

Apoptosis yang dideteksi dengan caspase-3 berkaitan dengan kematian sel dan repopulasi sel tumor. Repopulasi sel tumor akan membuka peluang yang lebih besar pada fase dalam siklus sel yang lebih radiosensitif. Untuk meyakinkan adanya korelasi antara indeks apoptosis caspase-3 dengan keberhasilan pelaksanaan kemoradioterapi diperlukan suatu penelitian mengenai respons radioterapi dalam waktu yang lebih lama dengan jumlah sampel penderita yang lebih banyak, sekaligus untuk mengetahui korelasi antara indeks caspase-3 dengan *survival* (peluang hidup bebas kanker servik) selama 5 atau 10 tahun.

#### 4. KESIMPULAN

Sebelum tindakan kemoradioterapi ditemukan adanya kecenderungan perbedaan nilai AgNOR antara indeks apoptosis tinggi dan rendah. Proliferasi sel yang diamati dengan AgNOR dan MIB-1 sebelum kemoradioterapi tidak menunjukkan adanya korelasi dengan respons jaringan kanker setelah kemoradioterapi.

Indeks apoptosis yang tinggi sebelum kemoradioterapi berkorelasi dengan

besarnya proporsi sel kanker yang sensitif terhadap radiasi, sehingga memberikan respons kemoradioterapi lebih baik dibanding indeks apoptosis yang rendah.

Indeks apoptosis caspase-3 yang diperoleh dapat dijadikan sebagai salah satu pertimbangan penjadwalan pemberian pengobatan kanker servik dengan kemoradioterapi.

## 5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Dana Penelitian Peningkatan Kemampuan Penelitian dan Perekayasa Tahun Anggaran 2010 dan Dana Penelitian PTKMR-BATAN Tahun Anggaran 2010, serta telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, No.PT 02.FK/ETIK/2010. Dengan terlaksananya penelitian ini penulis menyampaikan terima kasih kepada Kepala Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional; Kepala Departemen Radioterapi, Kepala Departemen Patologi Anatomi, Kepala Departemen Obsterik Ginekologi, Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo, Jakarta; dan Rumah Sakit Hasan Sadikin, Bandung.

## 6. DAFTAR PUSTAKA

1. Didit T, Rukmini M. Cancer in Indonesia, present and future. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32 Suppl 1: S17-21.
2. Mufyala S, Wofson AH. Cervical cancer. In: Lu JJ, Brady LW, editors. *Radiation oncology*. Springer; 2008.
3. Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* 2005;104: 1129-37.
4. Wilson GD, Saunders M, Stanley D, Frances MD, Francesca MB, Paul I R, et al. Pre-treatment proliferation and the outcome of conventional and accelerated radiotherapy. *European Journal Of Cancer* 2006;4(2): 363-71.
5. Pedicini P, Antonio N, Lidia S, Barbara AJF, Daniela A, Marta C, et al. Correlation between egfr expression and accelerated proliferation during radiotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Radiation Oncology* 2012;7:143-54.
6. Eriksen JG, Steiniche T, Askaa J. The prognostic value of epidermal growth factor receptor is related to tumour differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Rad Onc Bio Phys* 2004;58: 561-6.
7. Wilson GD. Proliferation models in tumours. *Int J Radiat Biol* 2003 July; 79( 7): 525-30.
8. Gasinska A, Fowler JF, Lind BK. Influence of overall treatment time and radiobiological parameters on biologically effective doses in cervical cancer patients treated with radiation therapy alone. *Acta Oncol* 2004;43: 657-66.
9. Ree AH. Highly proliferative neuroendocrine carcinoma – influence of radiotherapy fractionation on tumor response. *Radiation Oncology* 2008; 3: 13-7.
10. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ.

- Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*;2008;9: 231–34.
11. Lindboe C F, Torp SH. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. *J Clin Pathol* 2002;55(6): 467–71.
  12. Trere D. AgNOR staining and quantification. *Micron* 2000;31: 127–31.
  13. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 2005;5: 231-38.
  14. Belka C, Jendrossek V, Pruschy M, Vink S, Verheij M, Budach W. Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58: 542-54.
  15. Liao X, Che X, Zhao W, Zhang D, Long H, Chaudhary P, et al. Effects of propranolol in combination with radiation on apoptosis and survival of gastric cancer cells in vitro. *Radiat Oncol* 2010;5: 98.
  16. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4: 95-104.
  17. Xia L, Xue XZ. Immunohistochemical study of NF- $\kappa$ B p65, c-IAP2 and caspase-3 expression in cervical cancer. *Oncology Letters* 2012;3: 839-44.
  18. Kurnia I, Suzuki Y, Budiningsih S, Andrijono A, Ramli I, Badri C, et al. Nucleolar organizer regions in squamous cell carcinomas of the uterine cervix treated with chemoradiotherapy. *Austral - Asian Journal of Cancer* 2009;8(2): 93-102.
  19. Oka K, Suzuki Y, Nakano T. High growth fraction at 9 Grays of radiotherapy is associated with a good prognosis for patients with cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000;89: 1526–31.
  20. Sherridan MT, West CML, Copper MA, Stratford IJ, Logue JP, Davidson ST, et al. Pretreatment apoptosis in carcinoma of the cervix correlates with changes in tumour oxygenation during radiotherapy. *British Journal of Cancer* 2000;82(6): 1177–82.
  21. FIGO. Staging classification and clinical practice guidelines of gynaecologic cancer. FIGO. Committee on Gynaecologic Oncology, 2000;70: 27-40.
  22. Pearcey R, Brundage M, Drouin P, Jeffrey J, Johnston D, Lukkah, et al. Phase III trial comparing radical radiotherapy with and without cisplatin chemotherapy in patients with advanced squamous cell cancer of the cervix. *Journal of Clinical Oncology* 2002;15(20): 966-72.
  23. Martinez AA, Orton CG, Mould RF, editors. *Brachytherapy HDR and LDR*. Leersum Netherlands: Nucletron International BV; 1990.
  24. Saibishkumar EP, Patel FD, Sharma SC, Karunanidhi G, Ghoshal S, Kumar V, et al. Prognostic value of response to external radiation in stage IIIB cancer cervix in predicting clinical outcomes: A retrospective analysis of 556 patients from India. *Radiotherapy and Oncology* 2006;79: 142–6.

25. Kurnia I, Ohno T, Kato S, Ezawa H, Noguchi J, Tsujii H. Histopathological radiation effect and MIB-1 expression in cervical cancer: comparison of early response by radiotherapy Wwith or without cisplatin. *Austral - Asian Journal of Cancer* 2005;4(4): 201-4.
26. Wong LC, Ngan ANY, Cheung DKL, Ng TY, Choy DTK. Chemoradiation and adjuvant chemotherapy in cervical cancer. *J Clin Oncol* 1999;17: 2055-60.
27. Harris M, Taylor G. *Medical statistics made easy*, Scion Publishing Ltd; 2008.
28. Kurnia I, Budiningsih S, Andrijono, Ramli I, Badri C. AgNOR sebagai marker proliferasi dalam penilaian respons awal radiasi pada kemoradioterapi kanker serviks. *Prosiding Seminar Nasional Keselamatan, Kesehatan dan Lingkungan IV dan International Seminar on Occupational Health and Safety I*; Depok: PTKMR-BATAN, FKM UI; 2008. p. 81-91.
29. Miller B, Sherrie F, Michael D, Hguy P. Nucleolar organizer regions in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1994;74(15): 3142-45.
30. Kurnia I, Heriawati, Juniarti, Ruth ES, Alatas Z, Syahrudin E, et al. Correlation between AgNOR, MIB-1 and radiotherapy response in lung cancer. *Proceeding of the International Conference and Basic Science*; Malang: Faculty of Science, University of Brawijaya; 2011. p. 45-9.
31. Kito, S, Katsuhide S, Hirohiko O, Kaya Y, Hiroyuki M, Michi F, et al. Cleavage of nucleolin and argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins in apoptosis-induced cells. *Biochemical and Biophysical Research Commun* 2003;300(4): 950–6.
32. Kim JY, Hyun Y, Kyu CL, You JH, Myung L, Stephen AR, et al. Tumor apoptosis in cervical cancer: its role as a prognostic factor in 42 radiotherapy patients. *Int J Cancer (Radiat Oncol Invest)* 2001;(96): 305–12.
33. Huang Q, Fang L, Xinjian L, Wenrong L, Wei S, Fei FL, et al. Caspase 3–mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nature Medicine* 2011; 17(7): 860-7.
34. Bhosley SM, Huilgol NG, Mishra KP. Apoptotic index as predictive marker for radiosensitivity of cervical carcinoma: evaluation of membrane fluidity, biochemical parameters and apoptosis after the first dose of fractionated radiotherapy to patients. *Cancer Detection and Prevention* 2005;29: 369–75.
35. Levine EL, Renehan A, Gossiel R, Davidson SE, Roberst SA, Chadwick C, et al. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 1995;37: 1–9.
36. Suzuki Y, Nakano T, Ohno T, Kato S, Niibe Y, Morita S, et al. Oxygenated and reoxygenated tumors show netter local control in radiation therapy for cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16: 306-11.
37. Lai SK, Wong CH, Li YP, Li HY.

- Caspase-3-mediated degradation of condensin Cap-H regulates mitotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 2011;18: 996–1004.
38. Connell PP, Weichselbaum RR. A downside to apoptosis in cancer therapy. *Nat Med* 2011;17(7): 780-2.
39. Liao X, Che X, Zhao W, Zhang D, Long H, Chaudhary P, et al. Effects of propranolol in combination with radiation on apoptosis and survival of gastric cancer cells in vitro. *Radiat Oncol* 2010;5: 98.

